

M. L. Mone

Düsseldorf 1979.

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
und Virologie der Universität Düsseldorf
Direktor: Professor Dr. P. Naumann

Über den Nachweis des Immunglobulin A mit Hilfe
des Latex-Agglutinationstestes



Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Marie-Luise Mones, geb. Conrad

1979



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf.

Der Dekan
gez. Prof. Dr. Reinauer

Referent
gez. Prof. Dr. W.A.K. Schmidt

Korreferent
gez. Priv.-Doz. Dr. Trobisch

Inhaltsübersicht

	Seite
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
3. Material und Methoden	10
3.1 Aufbereitung des Anti-Human-IgA und Latexsensibilisierung	10
3.11 Reinigung des Cellulose-Ionenaustauschers	10
3.12 Anti-Human-IgA-Aufbereitung	11
3.13 Latex-Probe-Sensibilisierung	11
3.14 Kaninchen-Herz-Extrakt-Herstellung (KHE)	12
3.15 Ermittlung der für den Latextest optimalen KHE-Konzentration	12
3.16 Ermittlung des günstigsten Beladungs- verhältnisses Anti-IgA / Latex	13
3.17 Latexsensibilisierung	14
3.2 IgA-Latex-Agglutinationstest (IgA-LA-Test)	14

	Seite
3.3 Trennung der Immunglobuline	15
3.31 Trennung durch Zentrifugation	15
3.32 Trennung durch Säulenchromatographie	16
3.4 Kaolinbehandlung von Nabelschnurseren	16
4. Ergebnisse	17
4.1 Spezifität des IgA-LA-Testes	17
4.2 Empfindlichkeit des IgA-LA-Testes	18
4.3 Richtigkeit des IgA-LA-Testes	19
4.4 Reproduzierbarkeit der IgA-LA-Test- ergebnisse	20
5. Diskussion	22
6. Literaturverzeichnis	26

1. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird ein Latex-Agglutinationstest (IgA-LA-Test) als Verfahren zur semiquantitativen Bestimmung von Immunglobulin-A beschrieben und hinsichtlich Spezifität, Empfindlichkeit, Richtigkeit und Reproduzierbarkeit seiner Meßergebnisse untersucht. Grundlage des Verfahrens ist, analog zu den Bestimmungsmethoden für IgG und IgM nach Schmidt, Klein und Brade (27, 28), die Fähigkeit des IgA, entsprechend sensibilisierte Latexpartikel zu agglutinieren.

Um die Frage der Spezifität des IgA-LA-Testes zu klären, wurden Serumproben erwachsener Normalpersonen vor und nach Hitzebehandlung bei 56°C, Serumproben gesunder Neugeborener und Sputumproben gesunder Erwachsener im Saccharose-Dichtegradienten 24 Stunden bei 30.000 rpm zentrifugiert und anschließend fraktioniert. Dabei gelang es, hinsichtlich der Immunglobuline nur IgA-, IgG- oder IgM-haltige Fraktionen zu isolieren. IgA-haltige Fraktionen konnten außerdem durch säulenchromatographische Trennung eines Erwachsenenserums gewonnen werden. Kreuzreaktionen zwischen IgG, IgA und IgM ließen sich mit Hilfe der isolierten Fraktionen ausschließen.

Die Empfindlichkeit des Testes wurde deutlich bei Verdünnungsversuchen an Standardseren der Behringwerke mit bekanntem IgA-Gehalt; noch eine nur 0,03 mg IgA/dl enthaltende Lösung vermochte Anti-IgA-Latex zu agglutinieren.

Die Richtigkeit der IgA-LA-Methode wurde durch den Vergleich mit einem in der Klinik routinemäßig angewandten Verfahren zur quantitativen IgA-Bestimmung geprüft. Es wurden die IgA-Titer von 20 Seren erwachsener Normalpersonen nach der IgA-LA-Methode ermittelt, während der absolute IgA-Gehalt gleichzeitig mit Hilfe der einfachen radialen Immundiffusion bestimmt wurde.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Dem empirischen Median der IgA-LA-Testergebnis-Rangliste von 1:19.500 entsprach als Lagemaß der Immundiffusions-Testergebnisse ein arithmetischer Mittelwert von 207,5 mg IgA/dl Serum. Nach Erstellen eines Scatterdiagramms aus den Ergebnispaaen beider IgA-Bestimmungsmethoden ließ sich ein gewisses Maß an Korrelation zwischen ihnen feststellen.

Um die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse zu prüfen, wurden aus drei Standardseren (Behringwerke) mit bekanntem IgA-Gehalt jeweils 25 Stichproben entnommen und deren IgA-Titer an jeweils verschiedenen Tagen bestimmt. Als maximale Abweichung der Einzelergebnisse vom empirischen Median wurde bei keiner der drei Meßreihen der Wert von $\pm$ einer Titerstufe überschritten. Auch bei Mehrfachbestimmungen von IgA in 36 Erwachsenenseren zeigte sich eine gute Reproduzierbarkeit der Testergebnisse.

2. Einleitung

Nach internationaler Übereinkunft werden mit Antikörper-eigenschaften ausgestattete Verbindungen als Immunglobuline bezeichnet und, ihren physikochemischen Besonderheiten entsprechend, bestimmten Klassen oder Subklassen zugeordnet.

Gemeinsam ist den bis heute bekannten Immunglobulinen der Aufbau aus leichten (L) und schweren (H) Polypeptidketten. In IgD, IgG, IgA und IgE sind über Disulfidbrücken und nicht-kovalente Bindungen jeweils zwei H-Ketten untereinander und jede für sich mit einer L-Kette so verknüpft, daß Y-förmige Sekundärstrukturen mit zwei Antigen-Bindungsstellen an den Enden der Klammeröffnung resultieren. Ein Sekret-IgA-Molekül enthält zwei, ein IgM-Molekül fünf solcher Viererketten. Beide Immunglobuline tragen als weiteres Polypeptid eine sogenannte J-Kette (12). Sekret-IgA hat zusätzlich eine sekretorische Komponente, die aufgrund starker nicht-kovalenter Bindungskräfte den Untereinheiten anhaftet (33).

Die Einteilung der Immunglobuline in Klassen und Subklassen wurde mit der Feststellung möglich, daß die Primärstruktur der C-terminalen H- und L-Kettenbereiche mehr oder weniger konstant ist. So entsprechen den fünf Ig-Klassen fünf H-Kettenarten (δ , μ , γ , α , ϵ), die zum Teil mehrere Typen aufweisen. Zum Beispiel kommen von den γ -Ketten vier Typen physiologischerweise im Blut vor, wobei γ_1 den Hauptanteil liefert (16). Von den α -Ketten sind nur zwei, für mono- und dimeres IgA gleichermaßen charakteristische Typen bekannt (1). Von den L-Ketten kennt man bisher zwei Typen (κ , λ), die unter normalen Bedingungen in IgG und sehr wahrscheinlich in IgA sowie IgM im Verhältnis 2:1 vorliegen.

Anders als in den C-terminalen Abschnitten der

H- und L-Ketten, verhalten sich die Aminosäuresequenzen N-terminal, wo sie äußerst variabel sind und die Antikörperspezifität des entsprechenden Immunglobulins determinieren. Während die Bindung des Antigens allein durch diese aktive Stelle im Ig-Molekül bewirkt wird, sind nicht durch ein Antigen bestimmte Antikörpereigenschaften und Funktionen, wie Bindungsvermögen an die Gewebe, Kopplung an Komplement, Plazentarpassage oder metabolische Funktionen, an den C-terminalen Ig-Molekülteil gebunden.

Im Hinblick auf den Bildungsmechanismus der Antikörper im Organismus wäre die Beantwortung der Frage nach der Existenz oder Nichtexistenz sogenannter primärer Antikörper von grundsätzlicher Bedeutung. Dies sind Immunglobuline, die spontan, ohne vorherigen Antigenreiz entstanden sind und die Fähigkeit einer spezifischen Reaktion mit dem später hinzutretenden Antigen besitzen.

In seiner Arbeit über die Entwicklungsstufen der Immunglobuline kommt Günther (7) zu dem Schluß: "IgD tritt anscheinend als frühe Phase der Antikörperproduktion und Vorläufer des IgM auf, ontogenetisch offenbar als überhaupt erstes Immunglobulin noch vor dem Einwirken der Antigenreize. Damit wäre die lange umstrittene Frage, ob es natürliche, das heißt ohne Antigenreiz, allein durch genetische Information entstandene Antikörper gibt, positiv entschieden, und zugleich wären diese natürlichen Antikörper als der Immunglobulinklasse IgD zugehörig identifiziert." Wie Günthers (8, 9) weiteren Ausführungen zu entnehmen ist, verfügt der Organismus über wenigstens zwei ontogenetische Ig-Entwicklungslinien. Während die eine von der IgD- über die IgM- zur IgG-Produktion führt, verläuft die andere, entwicklungsgeschichtlich jüngere, von der IgD- über die IgM- zur IgA-Produktion.

Die quantitative Bestimmung der einzelnen Immun-

globulinklassen im Serum gewinnt in der Klinik immer mehr an Bedeutung. Sie erlaubt unter anderem die differenzierte Beschreibung und Beurteilung immunproliferativer Erkrankungen, sowie primärer oder sekundärer Immundefekte.

Neben totaler Aplasie aller lymphatischen Gewebe und damit Animmunität, werden bei den primären, meist genetisch bedingten Immundefekten auch partielle Aplasien des zentralen und / oder peripheren lymphatischen Gewebes beobachtet. Ein Beispiel ist die von Bruton erstmals beschriebene Aplasie des plasmazellulären Systems, bei normalem Thymus, ohne weitere lymphatische Systemstörung. Von dieser $\text{A}\gamma$ -Globulinämie betroffene Säuglinge sind nicht in der Lage, erkennbare Mengen IgG, IgA oder IgM zu bilden. In Erscheinung tritt dies gegen Ende des ersten Trimenons, wenn infolge Abbau des mütterlichen IgG ein Antikörper-Mangelzustand eintritt, der nicht ausgeglichen werden kann. Es kommt zu rezidivierenden bakteriellen Infektionen, wie Sinusitiden, Otitiden, Bronchitiden und Pneumonien.

Ein anderes Beispiel primären Immunitätsmangels ist die $\gamma\text{A-A}\gamma$ -Globulinämie, bei der aufgrund einer Partialinsuffizienz des plasmazellulären Systems ein isolierter IgA-Mangel vorliegt. Zwar kommt dieser Defekt auch bei völlig Gesunden vor, doch wurde er wiederholt in Kombination mit abortivem Ataxie-Teleangiektasie-Syndrom oder mit intestinalen Störungen beobachtet (23, 30). Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß Crabbé und Heremans (3) in der Dünndarmschleimhaut von Patienten mit Steatorrhoe und selektivem IgA-Mangel nur sehr wenige Plasmazellen fanden, die IgA enthielten, obwohl dort normalerweise IgA-, IgG- und IgM-haltige Zellen im Verhältnis 20:3:1 vorkommen (2, 4, 10).

Dem primären steht ein sekundärer, symptomatischer Immunitätsmangel gegenüber. Er kann die Folge einer autochthonen Immunzellsystem-Erkrankung sein, kann durch pharmakodynamische

Einflüsse sowie Strahlenbelastung entstehen, oder wenn andere Erkrankungen das Immunsystem mitbefallen. Sogar das Altern alleine bewirkt einen meßbaren Immunitätsverlust.

Sailer, Lutz und Hartwich (25) fanden bei ihren Untersuchungen an Patienten mit gesicherter Lymphogranulomatose im Stadium der Organmanifestation eine signifikante Erniedrigung der IgM-Werte im Serum. An den gleichen Patienten testeten sie die immunsuppressive Wirkung therapeutischer Maßnahmen. Vergleiche mit einer nicht therapierten Gruppe zeigten, daß eine Strahlenbehandlung den Abfall der IgM-, IgG-, besonders aber der IgA-Konzentration zur Folge hat, während bei Zytostatika-Anwendung allein die IgM-Werte signifikant abfallen.

Wie diese Ergebnisse andeuten, ist im Verlauf einer Zytostatika- oder Strahlenbehandlung mit einem immunsuppressiven Effekt und so mit mehr oder weniger stark ausgeprägter Infektbereitschaft des Patienten zu rechnen. Analog zu anderen Fällen, in denen eine Immunsuppression bewußt herbeigeführt wird, sei es um pathogene Immunreaktionen zu stoppen, oder die Abstoßung eines Transplantates zu verhindern, ist hier eine regelmäßige Überwachung des Immunglobulinstatus angebracht.

Auch ein hepatologisches Untersuchungsprogramm sollte Immunglobulinbestimmungen enthalten. Einige Autoren (5, 19) berichteten, daß IgG und mit Einschränkung IgM (nicht aber IgA) mit dem Ausmaß intrahepatischer Mesenchymaktivität korrelieren, daß IgG und IgM als sogenannte Mesenchymparameter eine Beurteilung hepatischer Entzündungsaktivität und im Rahmen von Verlaufskontrollen eine prognostische Aussage ermöglichen. Für eine Differenzierung chronischer Leber-Erkrankungen sind Immunogramme hingegen wenig geeignet. Sailer, Grabner und Berg (24) beispielsweise bestimmten quantitativ die Immunglobuline IgG, IgA und IgM bei insgesamt 117 Patienten,

die sie aufgrund histologischer Kriterien in Gruppen mit Leberepithelverfettung, chronisch persistierender Hepatitis, chronisch aggressiver Hepatitis und Leberzirrhose unterteilt hatten. Zwar fanden sie statistisch zum Teil hochsignifikante Gruppenunterschiede, sowie eine Zunahme der Ig-Konzentration im Serum mit dem Schweregrad der Erkrankung, doch streuten die Meßwerte innerhalb der einzelnen Gruppen so erheblich, daß zum Beispiel ein Patient mit 330 mg IgA/dl, 200 mg IgM/dl und 1500 mg IgG/dl ebenso der gesunden Kontrollgruppe wie der Gruppe mit Leberzirrhose angehören könnte.

Von besonderer Bedeutung ist die quantitative Bestimmung des Serum-IgA und -IgM in der Neugeborenenperiode. Unter physiologischen Bedingungen besteht zum Zeitpunkt der Geburt eine partielle Hypogammaglobulinämie. IgA und IgM sind, da sie im Gegensatz zu IgG nicht plazentagängig sind, nicht oder nur in Spuren nachweisbar, während IgG als Leihimmunität von der Mutter in ausreichender Konzentration vorhanden ist (32). Unter pathologischen Bedingungen, bei intrauterinen Infektionen, ist der Fetus etwa ab 20. Schwangerschaftswoche in der Lage, selbst Immunglobuline zu bilden. Der IgA- und IgM-Anteil an den Immunglobulinen des kindlichen Blutes zum Zeitpunkt der Geburt ist somit, falls kein maternofetaler Blutübertritt infolge Plazentaleck stattgefunden hat, eine fetale Eigenproduktion. Das heißt, erhöhte IgA- und IgM-Werte im Nabelschnurblut eines Neugeborenen beweisen, daß pränatal eine immunologische Reaktion stattgefunden hat, also eine intrauterine Infektion vorliegt (11).

Zur quantitativen Bestimmung der einzelnen Immunglobulinklassen bedient man sich heute vor allem zweier Antikörpereigenschaften, der Fähigkeit, gelöste homologe Antigene zu präzipitieren, sowie homologe antigene Partikel zu agglutinieren. Eine relativ geringen Aufwand erfordernde, in der Klinik routinemäßig angewandte Methode zur quantitativen

Ig-Bestimmung, ist die auf Arbeiten von Mancini, Carbonara und Heremans (14) zurückgehende einfache radiale Immundiffusion. Als Reaktionsmedium dienen hierbei mit H-Kettenspezifischem Ig-Antiserum versetzte Gelplatten, die zylinderförmig ausgestanzte Startreservoirs für die zu untersuchenden Lösungen aufweisen. Beim Erreichen optimaler Konzentrationsverhältnisse bilden sich während des Diffusionsvorganges innerhalb des Gels Präzipitationskreise, deren Flächeninhalte den entsprechenden Ig-Konzentrationen der Probelösungen direkt proportional sind (6).

Apparativ aufwendiger ist ein wiederholt beschriebenes Autoanalyzerverfahren. Es beruht darauf, daß bei einer Suspension innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereiches die Streulichtintensität der Anzahl schwebender Teilchen proportional ist. So läßt sich nach einer Antigen-Antikörper-Reaktion aus der Stärke der Präzipitatbildung und damit dem Trübungsmaß auf die Antikörperkonzentration der untersuchten Probe schließen (15, 22).

Mehrere Autoren (18, 20, 26) berichteten in den letzten Jahren über ihre Erfahrungen mit Screeningtests zur Früherfassung prä- oder perinatal infizierter Neugeborener. Eines dieser nur wenige Minuten beanspruchenden Schnellverfahren arbeitet nach folgendem Prinzip. Anti-IgA-Pufferlösung mit der Fähigkeit, eine definierte IgA-Menge abzubinden, wird einer Neugeborenen-Serumprobe zugesetzt. Falls IgA im Überschuß vorliegt, agglutiniert es eine nun aufgetropfte Suspension aus Latexpartikeln, die mit IgA-spezifischem Antiserum beladen wurden. Da die Testlösungen von der Herstellerfirma so eingestellt werden, daß es erst bei Serum-IgA-Konzentrationen von mehr als 2 mg/dl nach Latexreagenz-Zugabe zur Agglutination kommt, gesunde Neugeborene diesen Wert aber erst um den fünften Lebensstag überschreiten, spricht ein positiv ausfallender Test vor diesem Termin für das Vorliegen einer prä- oder

perinatalen Infektion.

Die Fähigkeit der Immunglobuline, entsprechend sensibilisierte Latexpartikel zu agglutinieren, ist auch die Grundlage eines von Schmidt, Klein und Brade (28) beschriebenen Verfahrens zum Nachweis von IgG und IgM. Da dieses Analysenverfahren trotz geringen Kosten- und Zeitaufwandes eine hohe Aussagekraft besitzt, wird in der vorliegenden Arbeit eine analog aufgebaute semiquantitative IgA-Bestimmungsmethode beschrieben, hinsichtlich Spezifität, Empfindlichkeit, Richtigkeit und Reproduzierbarkeit untersucht, sowie ihre Anwendbarkeit in der klinischen Diagnostik getestet.

3. Material und Methoden

.1 Aufbereitung des Anti-Human-IgA und Latexsensibilisierung

.11 Reinigung des Cellulose-Ionenaustauschers

Anti-Human-IgA wurde durch Säulenchromatographie aufbereitet. Um für diesen Vorgang stets gleiche Ausgangsbedingungen zu schaffen, mußte das Säulenfüllmaterial vor der Benutzung bestimmten Behandlungen unterworfen werden. 16 g Cellex-D BIO-RAD wurden mit je 600 ml 0,5 n NaOH und 0,5 n NaCl versetzt und mit einem Magnetrührer so lange dispergiert, bis die gesamte Cellulose benetzt war und keine Luftblasen mehr aufstiegen (etwa 30 Minuten). Nach einer Sedimentationszeit von 15 bis 30 Minuten konnte der trübe Überstand abgossen werden. Der Bodensatz wurde in 600 ml 1 n NaCl aufgeschwemmt und nach einer gewissen Absetzzeit wieder vom Überstand befreit. Dabei wurde die Hauptmenge der Waschflüssigkeit durch Dekantieren, der Rest durch Vakuumfiltration entfernt. Nach mehrmaligem Waschen des Rückstandes mit 1 n NaCl wurde der feuchte Cellulosekuchen mit 600 ml 1 n HCl aufgenommen, suspendiert, gleich danach vakuumfiltriert und so lange mit destilliertem Wasser gewaschen, bis das Filtrat neutral reagierte. Der Rückstand konnte nun mit 0,05 M Phosphatpuffer (pH 8) aufgeschlämmt und durch dreimaliges Dekantieren und Resuspendieren auf den für die Säulenchromatographie gewünschten pH-Wert gebracht werden. Zuletzt wurde nochmals in 0,01 M Phosphatpuffer suspendiert, das Sediment aber nur mit 400 ml 0,01 M Phosphatpuffer aufgenommen und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert (34).

.12 Anti-Human-IgA-Aufbereitung

10 ml α -Ketten-spezifisches Anti-Human-IgA vom Kaninchen (Behringwerke) wurden nach 12stündiger Dialyse gegen 0,01 M Phosphatpuffer (pH 8) chromatographiert. Dazu diente eine Säule von 17 cm Länge und 2 cm Durchmesser, bestehend aus 8 g des vorbereiteten Cellex-D BIO-RAD. Nach vorsichtigem Aufsetzen des dialysierten Materials wurde mit 0,01 M Phosphatpuffer bei einer Tropfgeschwindigkeit von 1/sec eluiert. Die kontinuierliche Messung der optischen Dichte des Eluats bei 280 nm (Spektralphotometer mit Durchflußküvette) ermöglichte es, den Bereich größter Extinktion zu erfassen, und so zwei Fraktionen à 10 ml mit maximalem Anti-Human-IgA-Gehalt zu isolieren. Es folgte die Dialyse der beiden Fraktionen gegen 0,01 M Tris-HCl-Puffer (12 Stunden, pH 7,2) und bis zu ihrer Verwendung, Lagerung bei 4°C.

.13 Latex-Probe-Sensibilisierung

0,4 ml einer so (3.12) gewonnenen Fraktion, mit noch nicht quantitativ erfaßtem Anti-Human-IgA-Gehalt, wurden mit 0,01 M Tris-HCl-Puffer im Verhältnis 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 und 1:640 verdünnt. Zu 1 ml jeder Verdünnungsstufe kam 1 ml 1:15 verdünntes (0,9% NaCl) Bacto-Latex 0.81 (Difco). Vorsichtiges wiederholtes Schwenken der Gemische bei Zimmertemperatur (30 Minuten) bewirkte eine räumliche Annäherung der Einzelkomponenten und damit die Fixation von Anti-IgA an der Latexpartikel-Oberfläche. Es folgte eine halbstündige Zentrifugation bei 5.000 rpm, zweimaliges Waschen der Rückstände mit Tris-HCl-Puffer (0,01 M + 0,2 g Polyvinylpyrrolidon/l) und jeweils anschließende Zentrifugation. Zuletzt wurden die Rückstände mit je 1 ml Tris-HCl-

Puffer (0,01 M + 0,2 g Polyvinylpyrrolidon/l + 0,5 g Na-Azid/l zur Konservierung) aufgenommen und vor der Weiterverarbeitung wenigstens 24 Stunden bei 4°C gelagert.

.14 Kaninchen-Herz-Extrakt-Herstellung (KHE)

Zwei Kaninchenherzen (18 g) wurden von Fett und Bindegewebe befreit, mit der Schere zerkleinert und in einem vorher tiefgekühlten Mörser mit Pistill zerquetscht. Mit Eagle's "Minimum Essential Medium (MEM)" wurde der Gewebebrei auf 180 ml aufgefüllt, dispergiert und in Portionen von jeweils 1 ml bei -70°C verwendungsbereit gehalten (29).

.15 Ermittlung der für den Latextest optimalen KHE-Konzentration

Zur Vermeidung von Spontanagglutinationen der sensibilisierten Latexpartikel und damit zur Vermeidung falsch positiver Ergebnisse beim eigentlichen IgA-LA-Test, bewährte sich ein gewisser KHE-Zusatz zum Reaktionsmedium (MEM). Der Ermittlung dieses Zusatzes diente folgender Versuch. KHE wurde mit MEM im Verhältnis 1:20 bis 1:640 in 2er-Stufen verdünnt und jeweils 0,050 ml dieser Verdünnungen wurden auf WHO-Häm-agglutinations-Makroplatten in Form einer Schachbrett-Titration 0,025 ml der o. a. (3.13) Anti-IgA-Latexsuspension zugefügt. Die Makroplatten wurden nun vorsichtig geschwenkt, 15 Minuten geschüttelt (IKA-Schüttler S20; Janke und Kunkel), 60 Minuten ruhiggestellt, wieder geschwenkt und nochmals 15 Minuten gelagert. Bei der anschließenden Beurteilung zeigte sich, daß die Anti-IgA-Latexpartikel mit sehr geringem oder ohne KHE-Zusatz spontan agglutininieren, bei einem bestimmten KHE/MEM-Mischungsverhältnis solch unerwünschte Reaktionen

jedoch ausbleiben (Abbildung 1). Für den eigentlichen IgA-LA-Test erwies sich die größtmögliche (1:40) eine falsch positive Reaktion verhindernde KHE-Verdünnung als optimal.

.16 Ermittlung des günstigsten Beladungsverhältnisses
Anti-IgA / Latex

Ein 57 mg IgA/dl enthaltendes Standard-Immunglobulin (Behringwerke) wurde mit KHE/MEM (1:40; 3.15) im Verhältnis 1:1.000 bis 1:32.000 in 2er-Stufen verdünnt. Zu jeweils 0,050 ml dieser Verdünnungen wurden auf Makroplatten in Form einer Schachbrett-Titration 0,025 ml der o. a. (3.13) Anti-IgA-Latexsuspension gegeben. Die Bearbeitung der Platten sowie die Auswertung der Testreihen folgten in bekannter Weise. Wie Abbildung 2 erkennen läßt, vermochten Latexpartikel, die mit 1:40 oder stärker verdünntem Anti-IgA sensibilisiert worden waren, IgA-haltige Lösungen nur unvollständig oder gar nicht zu agglutinieren. Eindeutig positive Antigen-Antikörper-Reaktionen wurden nur in Vertiefungen mit hinreichend IgA-haltigen Lösungen (bis Standard-Verdünnung 1:8.000) und einer Anti-IgA-Verdünnung von 1:20 bis 1:5 sichtbar. Mitgeführte Kontrollen, die nur KHE/MEM und Anti-IgA-Latex enthielten, zeigten in keinem Fall Agglutinate.

Für die geplante Herstellung eines größeren Vorrates an sensibilisierten Latexpartikeln konnte, wie den Versuchsergebnissen zu entnehmen ist, mit 1:20 die wirtschaftlichste der möglichen Anti-IgA-Verdünnungen gewählt werden, ohne die Funktion des IgA-LA-Testes zu gefährden.

.17 Latexsensibilisierung

Unter Berücksichtigung der Vorversuchs-Ergebnisse (3.16; 3.13) wurden 10 ml aufbereitetes Anti-Human-IgA (3.12) mit Tris-HCl-Puffer (0,01 M, pH 7,2) auf 200 ml aufgefüllt und mit 200 ml verdünnter Latexsuspension (Bacto-Latex 0.81, verdünnt mit 0,9%iger NaCl im Verhältnis 1:15) zur Reaktion gebracht. Als Endprodukt resultierten 200 ml einer Anti-IgA-Latexsuspension, die nach Zusatz von 200 mg Polyvinylpyrrolidon und 500 mg Natriumazid/l, in Portionen zu 2 ml abgefüllt und bei 4°C gelagert, über Monate verwendbar blieben.

.2 IgA-Latex-Agglutinationstest (IgA-LA-Test)

Als Maß für den IgA-Gehalt einer Lösung (Serum, Sputum, etc.) diene der Titer. Werden zum Beispiel verschiedenen Verdünnungen eines Immunsersums gleiche Antigenmengen zugesetzt, so wird als Titer die größtmögliche Verdünnungsstufe bezeichnet, in der nach Antigenzugabe noch eine Agglutination zustande kommt.

Der IgA-LA-Test wurde folgendermaßen durchgeführt:
In log 10-Stufen mit KHE/MEM (3.15) vorverdünnte Serum- oder Sputumproben wurden auf WHO-Hämagglutinations-Makroplatten in 2er-Stufen - ähnlich einer steigenden geometrischen Folge - weiterverdünnt (Eppendorf-Pipette). Die Verdünnungen (0,050ml) wurden mit jeweils 0,025 ml Anti-IgA-Latexsuspension (3.17) versetzt. In beschriebener Weise (3.15) folgte die Nachbehandlung der fertig beschickten Platten bei Zimmertemperatur (22 ± 2°C). Zur Ermittlung der Titer wurden die Test-Verdünnungsreihen mit Hilfe einer Lupe inspiziert.

Da es sich beim Titer um keinen absoluten Wert handelt,

waren unsere IgA-LA-Testergebnisse nur unter konstanten Versuchsbedingungen miteinander vergleichbar und damit zu werten. Aus diesem Grund wurde zu jeder Testreihe eine Leerkontrolle (KHE/MEM + Anti-IgA-Latex) mitgeführt, um falsch positive Ergebnisse auszuschließen, und auf jeder Test-Platte eine Kontrollserum-Verdünnungsreihe bekannten Titters angelegt, zur Aufdeckung unerkannt gebliebener Abweichungen von den üblichen Test-Bedingungen.

.3 Trennung der Immunglobuline

.31 Trennung durch Zentrifugation

Immunglobuline mit unterschiedlichen Sedimentationsgeschwindigkeiten ließen sich durch Zentrifugation (24 Stunden bei 30.000 rpm; Beckman Ultrazentrifuge, Rotor SW 40) innerhalb eines geeigneten Trägermediums räumlich voneinander trennen. Als Trägermedium diente ein 12 ml umfassender linearer Dichtegradient, hergestellt aus 12,5%iger und 37%iger Saccharose in 0,02 M Phosphatpuffer pH 7,0 mit 0,15 M NaCl/l, geformt mit Hilfe des ISCO Gradientformer 570 bei 8°C in 14,2 ml fassenden Cellulosenitratröhrchen. Nach vorsichtigem Aufsetzen von 0,2 ml Serum bzw. 0,5 ml Sputum (Eppendorf-Pipette) auf die Oberfläche der Flüssigkeitssäule folgte die 24stündige Zentrifugation bei 30.000 rpm, während der die Immunglobuline, entsprechend ihren Sedimentations-Eigenschaften, bestimmte Positionen innerhalb des Gradienten einnahmen. Anschließend wurde der Röhrchenboden punktiert und der Röhrcheninhalt mit einer Geschwindigkeit von einem Tropfen pro Sekunde nach unten abgelassen. Unter Verwendung des LKB Ultrac Fraction Collector gelang es, dabei 40 Fraktionen á 0,3 ml zu isolieren.

.32 Trennung durch Säulenchromatographie

Der Versuch, Serum-IgG und -IgA säulenchromatographisch zu trennen, folgte dem Prinzip einer von Torrigiani und Roitt (31) sowie Laurell (13) beschriebenen Methode zur Trennung von Immunglobulinen. 2 ml Serum wurden 12 Stunden gegen eine Pufferlösung vom pH 8,5 (0,01 M Phosphatpuffer + 0,003 M NaOH/l) dialysiert und an einer Cellulosesäule (aufbereitetes Cellex-D BIO-RAD, 3.11; Säulenlänge 17 cm, Säulendurchmesser 2 cm) chromatographiert. Nach Aufsetzen des dialysierten Serums wurde unter spektralphotometrischer Kontrolle (Abbildung 3) zunächst mit 0,01 M Phosphatpuffer + 0,003 M NaOH/l (pH 8,5), dann schrittweise mit Phosphatpufferlösungen der pH-Werte 7,8 - 7,0 - 6,5 und 6,0 eluiert. Während einer Gesamtlaufzeit von 12 Stunden konnten dabei 80 Fraktionen á 6 ml aufgefangen werden, von denen einige eine Mischung aus IgG und IgA, andere nur IgG enthielten (Abbildung 4)

.4 Kaolinbehandlung von Nabelschnurseren

Um die Reproduzierbarkeit der IgA-LA-Testergebnisse bei der Untersuchung von Seren mit sehr geringem IgA-Gehalt (Nabelschnurseren) zu verbessern, bewährte sich die Elimination störender Serumbestandteile durch ihre Adsorption an Kaolin. 0,5 ml Nabelschnurserum wurden mit 1,5 ml Kaolinsuspension (25%ig; Flow) vermischt (Eppendorf-Reaktionsgefäße), 20 Minuten bei Zimmertemperatur geschüttelt und anschließend 1 Minute bei 12.000 rpm zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge). Im Überstand der Reaktionsgefäße wurde nun der IgA-Gehalt nach der LA-Methode bestimmt.

4. Ergebnisse

.1 Spezifität des IgA-LA-Testes

Zur IgA-Bestimmung nach der LA-Methode sollten Vollserum-Proben, lediglich verdünnt durch KHE/MEM (3.2), mit Anti-IgA-Latexsuspension zur Reaktion gebracht werden. Dabei stellt sich die Frage, ob das Anti-IgA-Latex-Reagenz streng spezifisch nur mit IgA reagiert, oder ob es möglicherweise zu Kreuzreaktionen mit den anderen Immunglobulinklassen kommt. Zur Klärung dieser Frage wurden die in relativ hoher Konzentration im Serum vorkommenden Immunglobuline G, A und M nach mehreren Verfahren isoliert und ihre Reaktionsfähigkeit mit Anti-IgA-, aber auch mit Anti-IgG- und Anti-IgM-Latex überprüft.

Der Gewinnung rein IgG-haltiger Proben dienten Nabelschnurseren gesunder Neugeborener, die aufgrund der Plazenta-Undurchlässigkeit für IgA und IgM, neben kleinen IgM- und zuweilen minimalen IgA-Mengen, die vom Feten selbst stammen, ausschließlich mütterliches IgG enthielten. Drei solcher Nabelschnurseren und zum Vergleich drei Seren erwachsener Normalpersonen wurden nach Zentrifugation im Dichtegradienten mit anschließender Fraktionierung hinsichtlich ihrer Immunglobulinmuster untersucht. Während beispielsweise die Fraktionen 25 bis 33 der Erwachsenenserum (Abbildung 5) sowohl Anti-IgG- als auch Anti-IgA-Latex agglutinierten, vermochten die entsprechenden Fraktionen der Neugeborenen (Abbildung 6) Anti-IgA-Latex nicht, wohl aber Anti-IgG-Latex zu agglutinieren. Außerdem gab es bei beiden Serum-Arten solche Fraktionen, die nur mit Anti-IgM-Latex reagierten.

Eine weitere Möglichkeit, IgG-reaktive Proben zu isolieren, bot die Serum-Hitzebehandlung (30 Minuten bei 56°C),

bei der es bekanntlich zu IgG-Aggregationen kommt (28). So zeigten entsprechend behandelte Erwachsenenserum nach Trennung durch Zentrifugation in den Fraktionen höchster Dichte (Fraktion 1 bis 10, Abbildung 7) deutliche Reaktionen mit Anti-IgG-Latex, nicht aber mit Anti-IgM- oder Anti-IgA-Latex. Wieder reagierten einige Fraktionen (12. bis 20.) spezifisch mit Anti-IgM-Latex, andere (23. bis 33.) sowohl mit Anti-IgA- als auch mit Anti-IgG-Latex.

Da sich die Immunglobulinklassen der Sekrete hinsichtlich ihrer Sedimentationskoeffizienten besonders deutlich voneinander unterscheiden, mit 7s für IgG, 11s für den Hauptanteil des Sekret-IgA (21) und 19s für IgM, wurden drei Speichelproben gesunder Erwachsener in bekannter Weise im Saccharose-Dichtegradienten zentrifugiert und fraktioniert. Wie auf Abbildung 8 zu sehen ist, reagierten die dabei gewonnenen Fraktionen Nr. 14 bis 17 spezifisch mit Anti-IgM-Latex, Nr. 19 bis 28 spezifisch mit Anti-IgA- und Nr. 29 bis 32 spezifisch mit Anti-IgG-Latex.

Schließlich gelang es mit Hilfe der Säulenchromatographie (3.32) eine große Anzahl von Fraktionen zu isolieren, die spezifisch mit Anti-IgG-Latex, nicht aber mit Anti-IgA-Latex reagierten. Einige Fraktionen, durch Elution mit Phosphatpuffer von pH 6 gewonnen, agglutinierten sowohl Anti-IgG- als auch Anti-IgA-Latex (Abbildung 3, 4).

.2 Empfindlichkeit des IgA-LA-Testes

Um die Empfindlichkeit des IgA-LA-Testes zu prüfen, wurden aus einem IgA-Standard der Behringwerke Lösungen unterschiedlicher IgA-Konzentration hergestellt. Es zeigte sich, daß eine Lösung mit 0,03 mg IgA/dl noch eine deutlich positive Reaktion mit Anti-IgA-Latex bewirkte. Geringere IgA-Konzen-

trationen waren nicht mehr sicher nachweisbar.

Eine obere Bestimmungsgrenze für die IgA-Konzentration in Serum und Sputum wurde nicht festgestellt. Als zweckmäßig erwies sich jedoch eine Vorverdünnung zu untersuchender Proben mit KHE/MEM (3.15). Vor Beginn des IgA-LA-Testes auf WHO-Hämagglutinations-Makroplatten (3.2) sollten Erwachsenen im Verhältnis 1:1.000, Sputumproben im Verhältnis 1:100 und Nabelschnurseren im Verhältnis 1:10 mit KHE/MEM verdünnt werden.

Leerwerte zeigten unter diesen Voraussetzungen bei keiner Titerstufe eine positive Reaktion.

.3 Richtigkeit des IgA-LA-Testes

Die Richtigkeit des IgA-LA-Testes wurde durch Parallelbestimmungen mit einer zuverlässigen anderen Methode sowie mit Hilfe von Standard-Immunglobulinen geprüft.

Hierbei wurde zur Beschreibung von Mehrfachbestimmungen nach der LA-Methode der arithmetische Mittelwert gewählt statt des geometrischen, der den Test-Verdünnungsreihen in Form geometrischer Folgen zwar eher angepaßt wäre, der jedoch eine nicht erreichbare Ablesegenauigkeit vortäuschen würde.

Bei 20 Seren gesunder Erwachsener hatten IgA-Bestimmungen nach der Methode der einfachen radialen Immundiffusion (Tri-Partigen, Behring), durchgeführt als Doppelbestimmungen, Mittelwerte zwischen 75 und 425 mg IgA/dl ergeben (Tabelle 1).

Wir danken Herrn Prof. Dr. K. Irmscher (II. Med. Universitätsklinik u. Poliklinik) für die Durchführung der Tests.

Die gleichen Seren nach der IgA-LA-Methode untersucht, ergaben im Mittel IgA-Titer von 1:10.000 bis 1:42.000 (Tabelle 1).

Zur Beurteilung der Korrelation zwischen den Ergebnissen beider IgA-Nachweismethoden wurde ein Scatterdiagramm erstellt (Abbildung 10).

Bei 10 nach der IgA-LA-Methode doppelt bestimmten Speichelproben gesunder Erwachsener lagen die Sekret-IgA-Titer-Mittelwerte zwischen 1:800 und 1:4.000 (Tabelle 3). Oon und Lee (21) fanden, ebenfalls ohne den Speichelfluß stimuliert zu haben, im Parotissekret erwachsener Normalpersonen - unter Verwendung einer modifizierten radialen Immundiffusionstechnik - durchschnittlich 4,5 mg Sekret-IgA/dl.

Standardseren (Behringwerke) mit bekanntem IgA-Gehalt von 57, 164 und 340 mg IgA/dl ergaben IgA-LA-Titer-Mittelwerte um 1:8.000, 1:32.000 und 1:80.000 (Tabelle 4).

.4 Reproduzierbarkeit der IgA-LA-Testergebnisse

Um die Reproduzierbarkeit der IgA-LA-Testergebnisse zu prüfen, wurden drei Standard-Immunglobuline (Behringwerke) mit einem IgA-Gehalt von 57, 164 und 340 mg/dl (Standard I, II und III) 25mal jeweils an verschiedenen Tagen nach der IgA-LA-Methode untersucht. Es entstanden drei IgA-Titer-Urlisten, die durch Ordnen der IgA-Titer ihrer Größe nach in drei Ranglisten umgewandelt wurden.

Zur summarischen Beschreibung der Meßdaten ließen sich als Lagemaße die empirischen Mediane und als Streuungsmaße die Spannweiten der Ranglisten ermitteln. Als empirische Mediane ergaben sich die IgA-Titer 1:8.000, 1:32.000 und 1:80.000 für die Standardseren I, II und III. Bis zu zwei Titerstufen betrug die Spannweite jeder der drei Meßergebnis-

Ranglisten (Tabelle 4).

Da die Verdünnungsstufen im Ablesebereich des IgA-LA-Testes log 2-Stufen entsprechen, wurde aus den Zweierlogarithmen der Standard-IgA-LA-Testergebnisse als weiteres Lagemaß der arithmetische Mittelwert, als weiteres Streuungsmaß jeweils die empirische Varianz ermittelt und die empirische Standardabweichung der Stichprobe sowie der Variationskoeffizient errechnet (Tabelle 5). Die arithmetischen Mittelwerte der Zweierlogarithmen der IgA-LA-Titer betrugen für die Standardseren I, II und III 12,9 14,9 und 16,2 , die empirischen Standardabweichungen der Stichproben $\pm 0,58$ $\pm 0,49$ und $\pm 0,47$.

Ebenfalls an verschiedenen Tagen wurden 36 Erwachsenenserum mehrfach bestimmt. Die IgA-LA-Titer-Mittelwerte lagen zwischen 1:7.500 und 1:48.000. Dabei fielen die Mehrfachbestimmungen siebenmal etwa gleich aus, unterschieden sich 19mal um weniger als eine und zehnmal um eine bis anderthalb Titerstufen voneinander (Tabelle 2).

Wir danken Frau Ursula Krämer, Institut für Luft-
hygiene und Silikoseforschung, für ihre Beratung
bei der statistischen Berechnung.

5. Diskussion

Als Fortsetzung einer von Schmidt, Klein und Brade (28) veröffentlichten Arbeit über den Nachweis der Immunglobuline G und M mit Hilfe sensibilisierter Latexpartikel, befaßt sich die vorliegende Arbeit mit den speziellen Belangen eines Latex-Agglutinationstestes zum IgA-Nachweis in Vollserum und Speichel.

Dieser IgA-LA-Test erwies sich als streng spezifisch. Es wurden keine Kreuzreaktionen zwischen den im Serum in relativ hoher Konzentration vorkommenden Immunglobulinen G, A und M beobachtet. Zwischen Sekret-IgA und Serum-IgA (11s und 7s) unterscheidet der IgA-LA-Test -analog dem Doppel-Antikörper-System des Radioimmunassay (17)- nicht.

Die Ergebnisse von je 25 Stichproben aus drei IgA-Standardseren bekannter Konzentration (Behringwerke) erlauben eine Aussage über die Reproduzierbarkeit der IgA-LA-Testergebnisse. Bei einer Test-Ablesegenauigkeit von einer halben Titerstufe betrug die maximale Abweichung der Einzelwerte vom empirischen Median in zwei Fällen (Standard I und II) $\pm$ eine Titerstufe, im dritten Fall (Standard III) $\pm$ eine halbe Titerstufe. Dieses Maß an Reproduzierbarkeit ist zufriedenstellend, berücksichtigt man die ohnehin große Schwankungsbreite des normalen Serum-IgA-Gehaltes. Beispielsweise fanden Prellwitz, Kapp und Müller (22) Serum-IgA-Normwerte bei 292 Männern von 75 bis 370 mg/dl und bei 261 Frauen von 75 bis 325 mg/dl.

Wie der IgG- und IgM-LA-Test ist der IgA-LA-Test sehr empfindlich. Unter Verwendung der Stichproben-Ergebnisse der bereits genannten Standardseren I, II und III konnte nach Errechnen des geometrischen Mittelwertes jeder der drei

Meßreihen eine Regressionsgerade für den gefundenen IgA-LA-Titer in Abhängigkeit vom bekannten IgA-Gehalt konstruiert werden (Abbildung 9). Dem Diagramm ist zu entnehmen, daß beispielsweise 200 mg IgA/dl einen mittleren IgA-LA-Titer von 1:40.000 bewirken. Bestätigt wird die Empfindlichkeit der LA-Methode durch ermittelte IgA-Titer von 1:8.000 bis 1:48.000 in Serum- und 1:800 bis 1:4.000 in Speichelproben gesunder Erwachsener. 0,03 mg IgA/dl wurde als untere Nachweisgrenze des IgA-LA-Testes ermittelt.

Interessant ist hierzu folgender Vergleich: Grabner et al. (6) bestimmten unter Verwendung der einfachen radialen Immundiffusion eine untere Nachweisgrenze für IgA von 1,2 mg/dl. Schlimok et al. (26) berichteten, daß nach dem gleichen Prinzip unter Verwendung von LC-Partigen-Platten (Behring) eine IgA-Konzentration bis zu 0,4 mg/dl meßbar ist und ein von den Behringwerken angebotenes IgA-Latex-Reagenz noch IgA-Konzentrationen unter 0,4 mg/dl anzeigt.

Eine Versuchsreihe diente dem Vergleich unseres IgA-LA-Testes mit einem anderen Verfahren zur Bestimmung von Immunglobulinen. Diese Bezugsmethode war die einfache radiale Immundiffusion (Tri-Partigen Behring), die in der Klinik routinemäßig angewandt wird. 20 Seren erwachsener Normalpersonen wurden mit Anti-IgA-Latex und unter Verwendung von Tri-Partigen-Immundiffusionsplatten untersucht. Das Tri-Partigen-Verfahren lieferte Ergebnisse zwischen 75 und 425 mg IgA/dl, die sich um einen arithmetischen Mittelwert von 207,5 mg IgA/dl gruppierten. Der IgA-LA-Test ergab IgA-Titer von 1:10.000 bis 1:42.000 mit einem empirischen Median von 1:19.500. Im Scatterdiagramm (Abbildung 10) sind die IgA-Meßergebnisse beider Methoden als Wertepaare aufgeführt. Aus der Anordnung der Punktwolke läßt sich auf ein gewisses Maß an Korrelation zwischen den Ergebnispaares beider IgA-Nachweis-

methoden schließen.

Ein besonderer Vorteil des Latex-Agglutinationsverfahrens zur semiquantitativen IgA-Bestimmung liegt, wie bei den analog funktionierenden LA-Tests zur IgG- und IgM-Bestimmung (27,28), im geringen Arbeits-, Zeit- und Kostenaufwand bei relativ großer Aussagekraft. Während bei der einfachen radialen Immundiffusion (Tri-Partigen) zur schnellen quantitativen Bestimmung von IgA und IgG 6 Stunden, von IgM sogar 12 Stunden Mindest-Diffusionszeit gefordert werden, ist der IgA-LA-Test bereits nach einer Bearbeitungszeit von 90 Minuten auswertbar. Hinzu kommt die gute Haltbarkeit und Lagerfähigkeit einmal hergestellter Testmaterialien. Anti-IgG-, -IgA- und -IgM-Latex läßt sich bei 4°C wenigstens ein Jahr ohne Beeinträchtigung seiner Reaktionsfähigkeit aufbewahren.

Bei der Anwendung des IgA-, IgG- und IgM-LA-Testes ist allerdings zu bedenken, daß er mit seiner Ablesegenauigkeit unter Verwendung von Titerstufen im Rahmen üblicher Immunreaktions-Tests bleibt und gegenüber der radialen Immundiffusion, die den Diffusions-Ring-Durchmesser als Maß für die Konzentration der zu bestimmenden Immunglobuline verwendet, weniger präzise Aussagen erlaubt.

Aufgrund der hohen Empfindlichkeit des IgA-LA-Testes war es auch möglich, den IgA-Gehalt von Nabelschnurvollseren zu bestimmen. Anfänglich auftretende Schwierigkeiten hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Testergebnisse, ließen sich auf einen Einfluß des relativ ungünstigen Mischungsverhältnisses zwischen IgA und anderen, nicht den Immunglobulinen angehörenden Nabelschnurserum-Bestandteilen zurückführen. Die Elimination der störenden Agenzien durch Vorbehandlung entsprechender Seren mit einer Kaolinsuspension erwies sich als sinnvoll (Tabelle 6).

Abschließend kann gesagt werden: Der IgA-LA-Test erwies sich als streng spezifisch sowie hochempfindlich und die Reproduzierbarkeit seiner Meßergebnisse war zufriedenstellend. Aus diesem Grund und wegen des mit ihm verbundenen geringen Kosten- und Zeitaufwandes, ist er eine sinnvolle Ergänzung bisher in der Praxis angewandter Methoden zur IgA-Bestimmung.

6. Literaturverzeichnis

- .1 Adams, L.S., Jerry, L.M. :Detection of human IgA subclasses and allotypes by polymer-induced precipitation in agarose gel. Journal of Immunological Methods 6 (1974), 157.
- .2 Crabbé, P.A., Carbonara, A.O., Heremans, J.F. :The normal human intestinal mucosa as a major source of plasma cells containing A-immunoglobulin. Lab. Invest. 14 (1965), 235.
- .3 Crabbé, P.A., Heremans, J.F.: Selective IgA deficiency with steatorrhea. American Journal of Medicine 42 (1966), 319.
- .4 Crabbé, P.A., Heremans, J.F.: The distribution of immunoglobulin containing cells along the human gastrointestinal tract. Gastroenterology 51 (1966), 305.
- .5 Gleichman, E., Wepler, W., Otto, P. Deicher, H.: Quantitative Immunglobulin-Bestimmungen im Serum bei entzündlichen Leberkrankheiten. Acta Hepato-Splenologica 17 (1970), 255.
- .6 Grabner, W., Bergner, D., Sailer, D., Berg, G.: Untersuchungen zur Zuverlässigkeit quantitativer Immunglobulinbestimmungen (IgG, IgA, IgM) durch einfache radiale Immundiffusion. Clin. Chim. Acta 39 (1972), 59.
- .7 Günther, O.: Entwicklungsstufen der Immunglobulinklassen IgD/IgM. Deutsche Medizinische Wochenschrift 45 (1976), 1659.
- .8 Günther, O.: Entwicklungsstufen der Immunglobulinklassen IgM/IgG. Deutsche Medizinische Wochenschrift 46 (1976), 1698.

- .9 Günther, O.: Entwicklungsstufen der Immunglobulinklassen IgG/IgA. Deutsche Medizinische Wochenschrift 47 (1976), 1733.
- .10 Hermans, E. Huizenga, K.A., Hoffman, H.N., Brown, A.L., Markowitz, H.: Dysgammaglobulinemia associated with nodular lymphoid hyperplasia of the small intestine. American Journal of Medicine 40 (1966), 78.
- .11 Hohlweg-Majert, P., Grumbrecht, C., Hörst, M.: Semiquantitative Bestimmung der Immunglobuline IgM und IgA im Nabelschnurblut von 1000 Neugeborenen zur Früherfassung von intrauterinen Infektionen. Z. Geburtsh. Perinat. 178 (1974), 191.
- .12 Kobayashi, K. Vaerman, J.P., Heremans, J.F.: A facile method to isolate J-chain from polymeric serum IgA or IgM. Immunochemistry 11 (1974), 169.
- .13 Laurell, C.B.: Isolation of M-components. Medica Scandinavica 170 (1961), 60.
- .14 Mancini, Carbonara, Heremans : Immunochemical quantification of antigens by single radial Immundiffusion. Immunochemistry 2 (1965), 235.
- .15 Markowitz, H. Tschida, A.R.: Automated quantitative immunochemical analysis of human immunoglobulins. Clinical Chemistry 18 (1972), 1364.
- .16 Morell, A. Skvaril, F., Barandun, S.: IgG-Subklassen der menschlichen Immunglobuline. Karger AG Basel (1975), 69.
- .17 Nakajima, Sh., Gillespie, D.N., Gleich, G.J.: Differences between IgA and IgE as secretory proteins. Clin. exp. Immunol. 21 (1975), 306.

- .18 Neuhaus, F., Tympner, K.D.: Nachweis von Infektionen in der Neugeborenenperiode. diagnostik 9 (1976), 465.
- .19 Nilius, R., Zipprich, B., Lienhard, O., Busse, H.J., Eismann, R., Peters, J.E.: Quantitative Immunglobulinbestimmungen bei hepatobiliären Erkrankungen. Zsch. inn. Med. 28 (1973), 541.
- .20 Oehme, J., Pfirrmann, J., Gutzeit, D.: IgM-Latex-Test als Suchmethode für prä- und perinatale Infektionen. Klin. Pädiat. 184 (1972), 486.
- .21 Oon, C.H., Lee, J.: A controlled quantitative study of parotid salivary IgA-globulin in normal adults. Journal of Immunological Methods 2 (1972), 45.
- .22 Prellwitz, W., Kapp, S., Müller, D.: Vergleichende Methoden zur quantitativen immunologischen Bestimmung und Ermittlung von Normbereichen der Immunglobuline G, A, M, des Haptoglobins und Transferrins mit Hilfe der automatisierten Immunpräzipitationsreaktion. Z. Klin. Chem. Biochem. 9 (1974), 427.
- .23 Rockey, J.H., Hanson, L.A., Heremans, J.F., Kunkel, H.G.: Beta-2A aglobulinemia in two healthy men. J. Lab. and clin. Med. 63 (1964), 205.
- .24 Sailer, D., Grabner, W., Berg, G.: Das quantitative Verhalten der Immunglobuline (IgA, IgG, IgM) bei chronischen Lebererkrankungen. Deutsche Medizinische Wochenschrift 34 (1973), 1559.
- .25 Sailer, D., Lutz, H., Hartwich, G.: Quantitative Immunglobulinbestimmung bei Lymphogranulomatose. Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 79 (1973), 508.

- .26 Schlimok, G., Neuhaus, F., Welsch, H., Tympner, K.D.: Der IgA-Latex-Test. Ein schnelles Verfahren zum IgA-Nachweis. Klin. Pädiat. 186 (1974), 529.
- .27 Schmidt, W.A.K., Klein, M., Brade, H.: Ein quantitativer IgM-Nachweis mit sensibilisierten Latexpartikeln. Archives of Virology 48 (1975), 99.
- .28 Schmidt, W.A.K., Klein, M., Brade, H.: Ein empfindlicher Nachweis von Immunglobulin G und M mit Hilfe sensibilisierter Latexpartikel. Immunität und Infektion 5, (1977), 30.
- .29 Schmidt, W.A.K., Klein, M.: Ein Latex-Agglutinationstest (LA-Test) zur Typenbestimmung von Enteroviren. Archiv für die gesamte Virusforschung 43 (1973), 213.
- .30 South, M.A., Cooper, M.D., Wollheim, F.A., Good, R.A.: The clinical significance of IgA deficiency: Studies in patients with agammaglobulinemia and ataxie-telangiectasia. American Journal of Medicine 44 (1968), 168.
- .31 Torrigiani, G., Roitt, I.M.: Antiglobulin factors in sera from patients with rheumatoid arthritis and normal subjects. Ann. rheum. Dis. 26 (1967), 334.
- .32 Tympner, K.D.: Die Bedeutung quantitativer Immunglobulin-Bestimmungen (IgM, IgA) für die Diagnostik und Therapie von Infektionen in der Neugeborenen-Periode. Mschr. Kinderheilk. 119 (1971), 287.
- .33 Weicker, J. Underdown, B.J.: A study of the association of human secretory component with IgA and IgM proteins. The Journal of Immunology 114 (1975), 1337.
- .34 Williams, C.A., Chase, M.W. Methods in Immunology and Immunochemistry, 157.

Tab. 2

Eine Aufstellung der in 36 Erwachsenenseren mit Hilfe
der IGA-LA-Methode bestimmten IGA-Titer

Proben- Bezeichnung	IGA-Titer (Mehrfachbestimmungen)	arithmetische Mittelwerte der IGA-Titer	Proben- Bezeichnung	IGA-Titer (Mehrfachbestimmungen)	arithmetische Mittelwerte der IGA-Titer
41	1:12.000	1:12.000	Mu. 8	1:30.000	1:23.000
42	16.000	28.000	" 9	40.000	28.000
43	12.000	14.000	Se. 807/2	8.000	12.000
44	12.000	8.000	" 962/1	8.000	15.000
45	16.000	12.000	" 962/2	16.000	16.000
46	16.000	14.000	" 1188/1	12.000	18.000
47	20.000	16.000	" 1189/1	4.000	7.500
49	40.000	16.000	" 1197/1	16.000	24.000
51	20.000	24.000	" 1199/1	48.000	48.000
52	30.000	32.000	" 1253/1	24.000	27.000
53	60.000	48.000	" 1259/1	8.000	8.000
54	20.000	16.000	" 1260/1	32.000	32.000
56	40.000	32.000	" 1270/1	32.000	32.000
58	20.000	12.000	" 1272/1	48.000	37.000
59	24.000	24.000	" 1278/1	48.000	48.000
Nu. 2	30.000	16.000			
" 3	16.000	20.000			
" 4	30.000	24.000			
" 5	32.000	32.000			
" 6	32.000	30.000			
" 7	15.000	16.000			

Tab. 4

IgA-Titer-Ranglisten von je 25mal nach der IgA-LA-Methode untersuchten Standard-Immunglobulinen (I, II, III)

Rang Nr.	Standard-Ig I	Standard-Ig II	Standard-Ig III
1	1:4.000	1:16.000	1:40.000
2	4.000	16.000	40.000
3	4.000	24.000	40.000
4	4.000	24.000	60.000
5	6.000	24.000	60.000
6	6.000	24.000	60.000
7	6.000	24.000	60.000
8	8.000	24.000	60.000
9	8.000	32.000	80.000
10	8.000	32.000	80.000
11	8.000	32.000	80.000
12	8.000	32.000	80.000
13	8.000	32.000	80.000
14	8.000	32.000	80.000
15	8.000	32.000	80.000
16	8.000	32.000	80.000
17	8.000	32.000	80.000
18	8.000	32.000	80.000
19	8.000	32.000	80.000
20	8.000	48.000	80.000
21	12.000	48.000	120.000
22	12.000	48.000	120.000
23	16.000	48.000	120.000
24	16.000	48.000	120.000
25	16.000	64.000	120.000

Tab. 3

Mit der IgA-LA-Methode bestimmte IgA-Titer in 10 Speichelproben gesunder Erwachsener

Proben- Bezeichnung	IgA-Titer (Doppelbestimmungen)	arithmetische Mittelwerte der IgA-Titer
Ju 20.4	1:3.200	1:1.600
" 28.5	600	1.000
Ka 20.4	4.800	2.400
" 28.5	1.600	1.500
Kl 20.4	3.200	1.600
" 28.5	800	1.000
Mo 20.4	4.800	3.200
" 28.5	1.600	1.500
St 20.4	4.800	2.400
Th 20.4	4.800	2.400
		1:2.400
		800
		3.600
		1.550
		2.400
		900
		4.000
		1.550
		3.600
		3.600

Tab. 5

Statistische Daten, ermittelt aus den IgA-LA-Testergebnissen von je 25 Stichproben, dreier Standard-Immunglobuline der Behringwerke

	Standard Nr. I Batch Nr. 274 K	Standard Nr. II Batch Nr. 274 K	Standard Nr. III Batch Nr. 274 K
IgA-Konzentration	57 mg/dl	164 mg/dl	340 mg/dl
Anzahl der Stichproben	25	25	25
Spannweite der IgA-LA-Testergebnisse	Titer von 1:4.000 bis 1:16.000	1:16.000 bis 1:64.000	1:40.000 bis 1:120.000
Empirischer Median	1:8.000	1:32.000	1:80.000
Geometrischer Mittelwert der IgA-Titer	1:7.771	1:31.590	1:75.340
Arithmetischer Mittelwert der Zweierlogarithmen der IgA-Titer (= lb x)	12.924	14.944	16.202
Empirische Standardabweichung der Stichprobe (bezogen auf lb x)	$s = \pm 0,5833$	$s = \pm 0,4902$	$s = \pm 0,4746$
Variationskoeffizient (bezogen auf lb x)	$V = 4,513\%$	$V = 3,279\%$	$V = 2,929\%$

Tab. 6

Mit der IgA-LA-Methode bestimmte IgA-Titer in 4 Nabelschnurseren gesunder Neugeborener

Proben- Bezeichnung	IgA-Titer (Doppelbestimmungen) ohne Vorbehandlung der Proben	IgA-Titer (Doppelbestimmungen) mit Kaolin-Vorbe- handlung der Proben
NS 6	1:500 1:30	1:80 1:80
NS 7	1:80 1:160	1:120 1:160
NS 8	1:50 1:320	1:120 1:240
NS 9	1:500 1:100	1:240 1:160

KHE / MEM Mischungsverhältnis		MEM ohne KHE					
1:20		1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	
1:5	0	0	++	++++	++++	++++	++++
1:10	0	0	0	++	++++	++++	++++
1:20	0	0	0	0	+++	++++	++++
1:40	0	0	0	0	0	+++	0
1:80	0	0	0	0	0	0	0
1:160	0	0	0	0	0	0	0
1:320	0	0	0	0	0	0	0
1:640	0	0	0	0	0	0	0

Abb. 1

Schachbrett-Titration zur Ermittlung eines optimalen KHE-Zusatzes zum Reaktionsmedium (MEM)

+/ Spontan-Agglutination

Anti-IgA / Latex Mischungsverhältnis	Standard-Immunglobulin / KHE-MEM Mischungsverhältnis								KHE-MEM
	1:1.000	1:2.000	1:4.000	1:8.000	1:16.000	1:32.000			
1:5	++++	++++	++++	++++	++	0			0
1:10	++++	++++	++++	++++	++	0			0
1:20	++++	++++	++++	++++	+++	0			0
1:40	+++	+++	+++	+	0	0			0
1:80	0	0	0	0	0	0			0
1:160	0	0	0	0	0	0			0
1:320	0	0	0	0	0	0			0
1:640	0	0	0	0	0	0			0

Abb. 2

Schachbrett-Titration zur Ermittlung des günstigsten Beladungsverhältnisses
Anti-IgA / Latex

+/ Agglutination

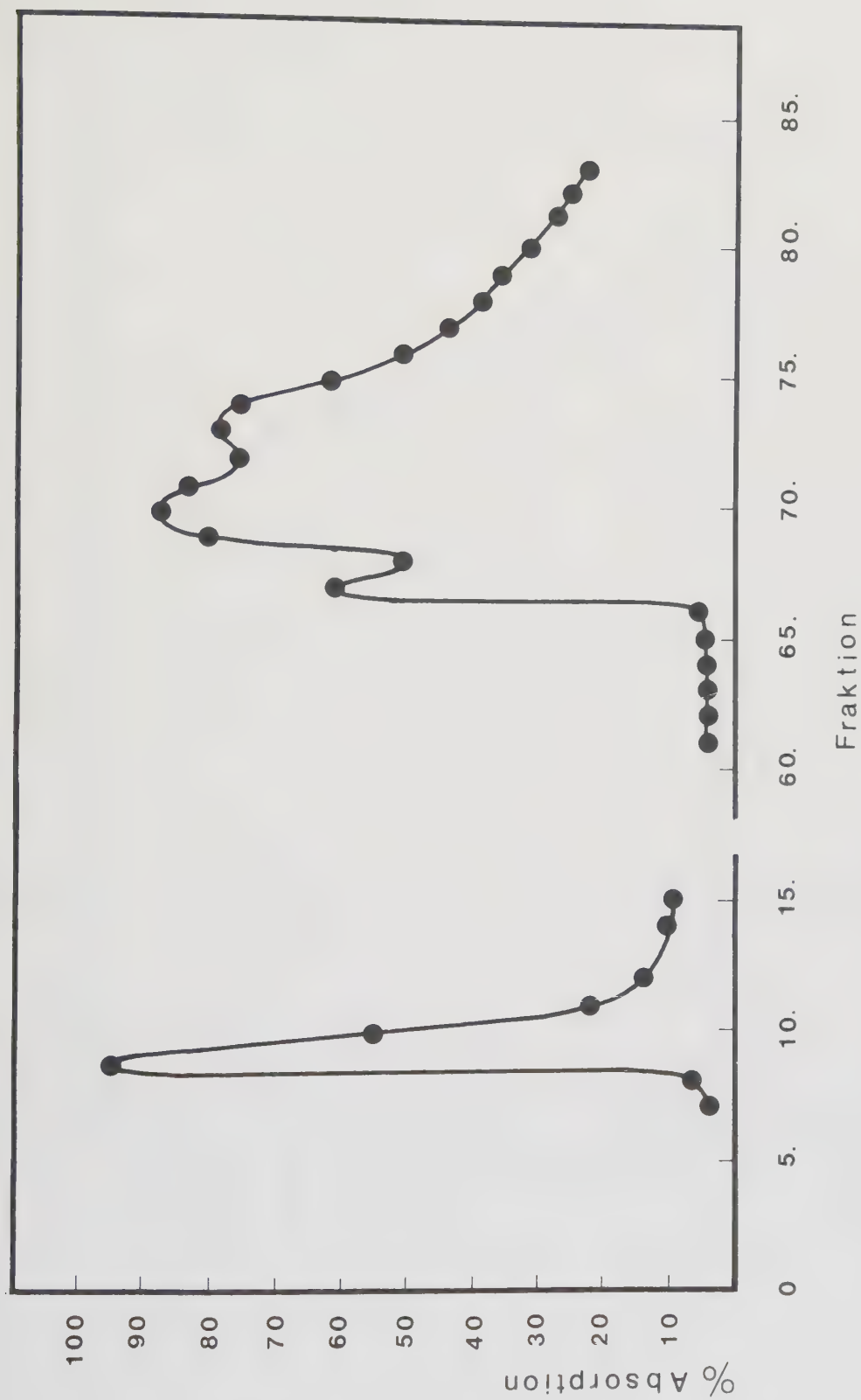


Abb. 3
 Spektralphotometrische Kontrolle der fraktionierten Säulenchromatographie
 einer Serumprobe.

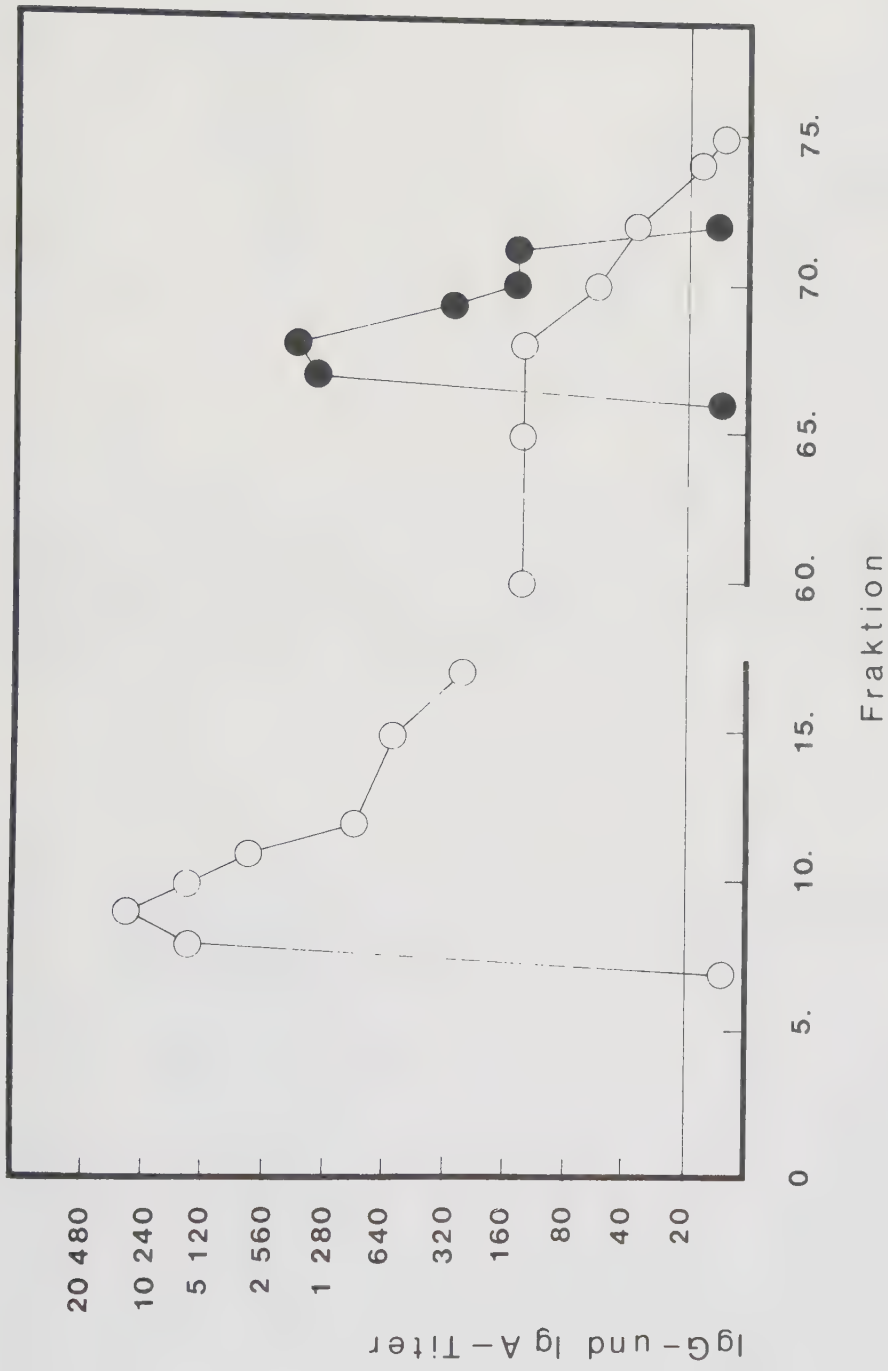


Abb. 4

LA-Titer verschiedener Fraktionen eines Serums nach säulenchromatographischer Trennung

○—○ IgG; ●—● IgA.

IgG-, IgM- und IgA- Titer

40 960
20 480
10 240
5 120
2 560
1 280
640
320
160
80
40
20

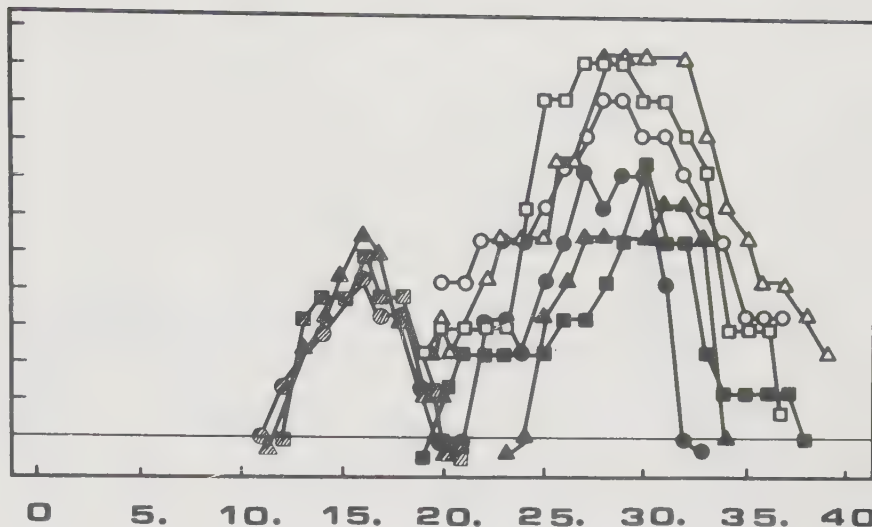


Abb. 5

Fraktion

LA-Titer verschiedener Fraktionen von Seren erwachsener Normalpersonen nach Zentrifugation im Dichtegradienten;
○●● Serum N. 42, △▲▲ Serum Nr. 45, □▨■ Serum Nr. 49,
○ ○ ○ IgG; ● ● ● IgA; ▨ ▨ ▨ IgM.

IgG-, IgM- und IgA- Titer

81 920
40 960
20 480
10 240
5 120
2 560
1 280
640
320
160
80
40
20

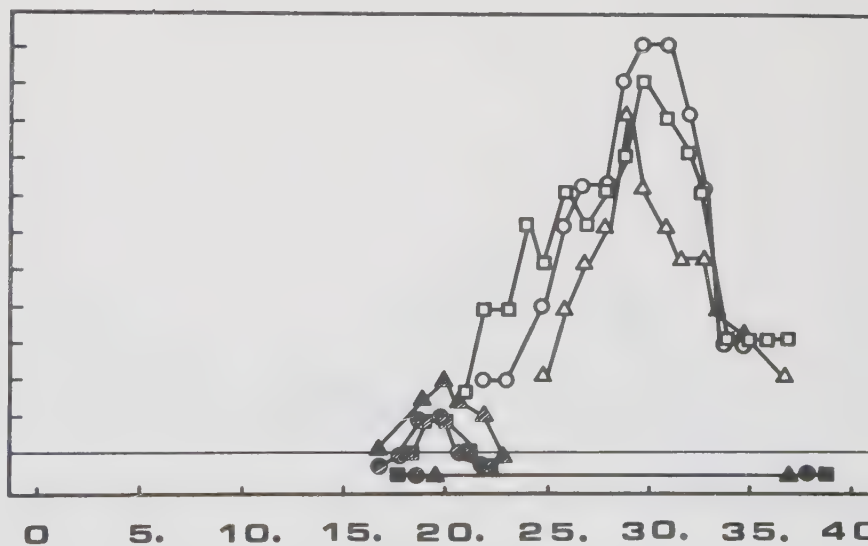


Abb. 6

Fraktion

LA-Titer verschiedener Fraktionen von Seren Neugeborener nach Zentrifugation im Dichtegradienten;
△▲▲ Serum Nr. 3, ○●● Serum Nr. 4, □▨■ Serum Nr. 5,
△△ ○○ □□ IgG; ▨▨ ▨▨ ▨▨ IgM; ▲▲ ●● ■■ IgA.

IgG, IgM- und IgA-Titer

40 960
20 480
10 240
5 120
2 560
1 280
640
320
160
80
40
20

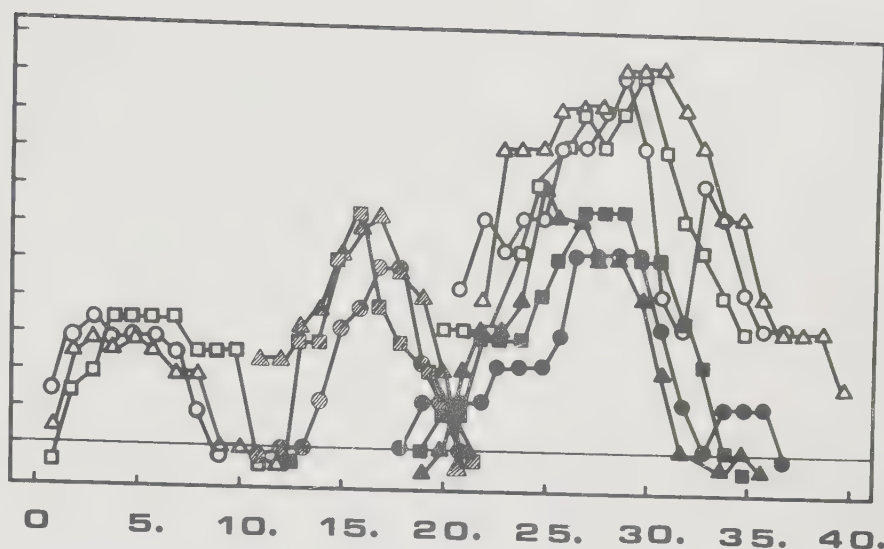


Abb. 7

Fraktion

LA-Titer verschiedener Fraktionen hitzebehandelter Seren (30 Minuten 56°C) erwachsener Normalpersonen nach Zentrifugation im Dichtegradienten;

○ ● ● Serum Nr. 41, △ ▲ ▲ Serum Nr. 46, □ ▨ ■ Serum Nr. 48
○ ○ △ △ □ □ IgG; ● ● ▲ ▲ ■ ■ IgA; ● ● ▨ ▨ ▲ ▲ IgM.

IgG, IgM- und IgA-Titer

40 960
20 480
10 240
5 120
2 560
1 280
640
320
160
80
40
20

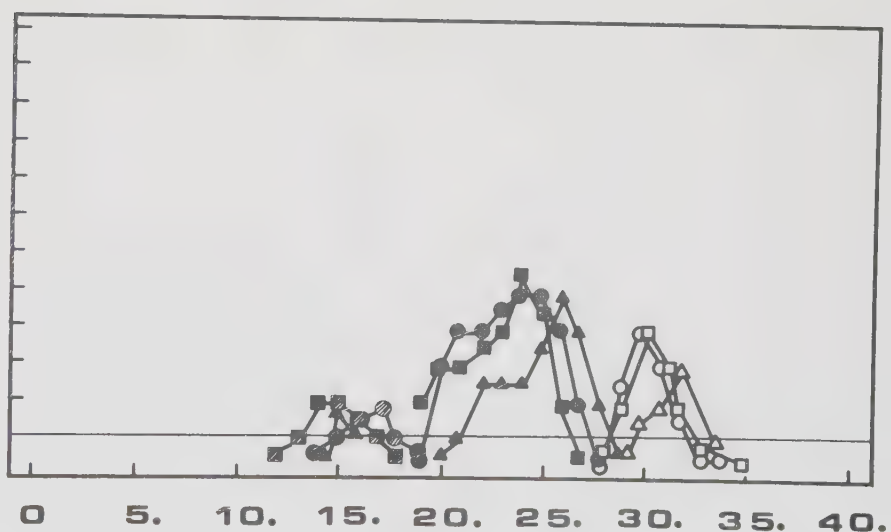


Abb. 8

Fraktion

LA-Titer verschiedener Fraktionen von Speichelpuben erwachsener Normalpersonen nach Zentrifugation im Dichtegradienten;

○ ● ● Speichelprobe Nr. 1, □ ▨ ■ Speichelprobe Nr. 2, △ ▲ ▲ Speichelprobe Nr. 3
○ ○ □ □ △ △ IgG; ● ● ■ ■ ▲ ▲ IgA; ● ● ▨ ▨ ▲ ▲ IgM.

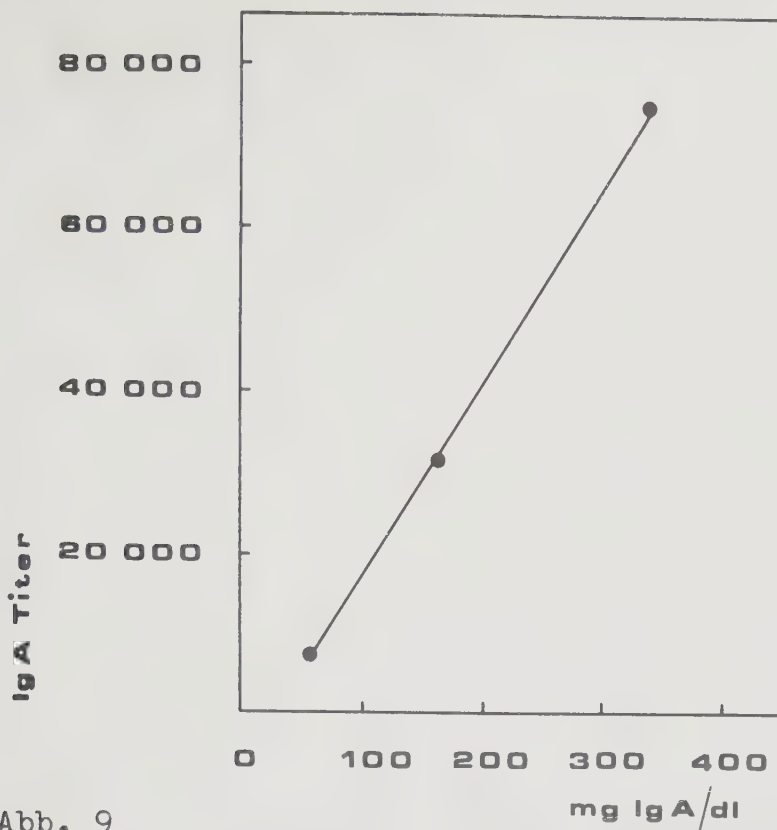


Abb. 9

Eine Regressionsgerade für den nach der LA-Methode ermittelten IgA-Titer in Abhängigkeit vom bekannten IgA-Gehalt dreier Standard-Immunglobuline (Behring)

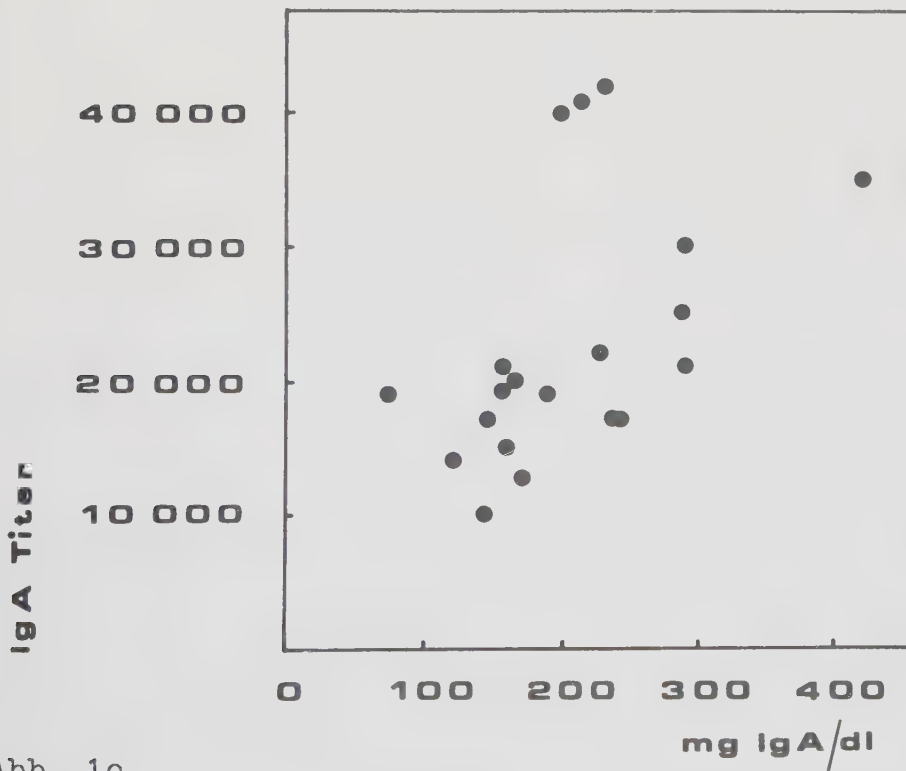


Abb. 10

Ein Scatterdiagramm, in dem die IgA-Meßergebnisse von 20 Erwachsenenseren sowohl nach der LA- als auch nach der einfachen radialen Immundiffusions-Methode bestimmt, als Wertepaare aufgeführt sind.

Lebenslauf

5. 4. 1938 geboren in Hilden als einziges Kind der Eheleute Wilhelm und Wilhelmine Conrad, geborene von Ohr
- 1944 - 1949 Besuch der Volksschule in Hilden
- 1949 - 1953 Besuch der Realschule in Hilden
- 1953 - 1968 Chemielaboranten-Lehre und Tätigkeit als Chemielaborantin in der chemischen Industrie
- 1970 Fachschulreifeprüfung an der Berufsaufbauschule in Solingen
- 1972 Hochschulreifeprüfung am W.-H.-Riehl-Kolleg in Düsseldorf
- 1972 - 1974 Studium der Humanmedizin an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- 1974 - 1978 Studium der Humanmedizin an der Universität Düsseldorf mit abschließendem Staatsexamen
- seit Dez. 1978 Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der Universität Düsseldorf.

